第5卷第3期增刊　　动物学研究　　Vol.5, No.3
1984年9月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Sept.,1984

一种同时显示哺乳动物染色体复制带和鉴别晚复制性染色体的新技术

王建华　张锡然　陈玉泽　施立明

（中国科学院昆明动物研究所）

摘　要

以一种改进的可以同时显示哺乳动物染色体复制带和晚复制性染色体的技术，可以在中国仑鼠（*Cricetulus griseus*），小鼠（*Mus musculus*），獴（*Herpestes auropunctatus*），赤麂（*Muntiacus muntjak*）和黑麂（*Muntiacus crinifrons*）五种哺乳动物中，清晰地显示染色体的复制带，性染色体的晚复制区域淡染也易于鉴别。在雌性个体中，遗传功能失活的晚复制X染色体淡染色，可以和常染色体以及另一条X染色体鉴别。此外，有些晚复制X染色体呈均匀地淡染色，而另一些晚复制X染色体上还出现一些深染的早复制带纹。在雄性赤麂和黑麂中，Y染色体是淡染色的晚复制染色体。这种改进的技术步骤简化，结果可靠，带纹也较清晰，淡染的晚复制染色体易于识别。

前　言

在细胞遗传学的许多工作中，以放射自显影技术研究染色体DNA的复制和识别晚复制的X染色体已得到广泛地使用（Mukherjee等，1964；Sharma等，1974）。但由于放射自显影技术本身的限制，难以确认染色体上精细的晚复制部位。Latt（1973）首先指出，BrdU掺入技术可以用以显示染色体上DNA复制带型。由于该技术简便，而且结果准确可靠，因而，在许多方面可以代替放射自显影技术，并已应用于人染色体DNA复制带型和性染色体晚复制的研究（Hoo等，1979；Scheres等，1982），有些作者（Stubblefield，1975；Ved Brat等，1979；Somssich等，1981）也以哺乳动物染色体作了类似的研究。我们对BrdU掺入技术作了改进，在五种哺乳动物（中国仓鼠、小鼠、獴、黑麂和赤麂）的染色体上均可显示清晰的复制带型，此外，不仅可以准确地识别晚复制的性染色体，而且还可以显示晚复制染色体上复制顺序的差异。

本文于1984年2月24日收到。

材料和方法

本研究所用的五种哺乳动物是雌性的中国仓鼠（*Cricetulus griseus*）细胞系（CHO），雌性小鼠（*Mus musculus*）和红颊獴（*Herpestes auropunctatus*）细胞株（KIZ-8304；KIZ-8303），黑麂（*Muntiacus crinifrons*）细胞株（雌性KIZ-8101，雄性KIZ-8201）和雄性赤麂（*Muntiacus muntjak*）细胞株（KIZ-7901）。除CHO引自T. C. Hsu 实验室外，其余均本实验室自建。

所有的细胞培养物均在含有15%小牛血清的199培养液中，37.5°C培养。黑麂、赤麂细胞传代后培养45小时，獴，小鼠细胞传代后培养23小时，加入5—溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）（100微克/毫升）继续避光培养6—8小时。CHO细胞传代后23小时，加入BrdU（100微克/毫升）分别避光培养2、3、5、6、8小时。细胞收获前2小时，加入秋水仙素（最终浓度为0.3微克/毫升）。用0.25%胰酶（Difco 1:250）消化收获细胞，用预热至37°C的0.5% KCl溶液低渗处理8分钟，按常规的空气干燥法制备染色体标本。

显带染色　室温下老化7天的染色体标本以Hoechst 33258（1微克/毫升，2 x SSC液配制）避光处理15分钟，水洗，晾干；在玻片上滴加2 x SSC，在日光灯下照射90分钟，水洗，晾干；再用87°C的Earle's液处理25—30秒钟，热蒸馏水冲洗，晾干。然后以新鲜配制的Wright/Giemsa-Sörensen磷酸盐缓冲液（1：1稀释，pH6.8）染色15—22分钟。

结果和讨论

（一）中国仓鼠

CHO细胞系是来源于中国仓鼠（*Cricetulus griseus*）卵巢的超二倍体细胞系，染色体数目为18—42。X染色体是一对亚中着丝点染色体。经BrdU掺入处理后，一条X染色体的短臂上显示带纹，整个长臂均呈现为淡染色的晚复制区（图1a，X），这与Stubblefield（1975）和Wang（1976）在雄性中国仓鼠上所观察到的结果一致。另一条X染色体全体淡染。这条染色体即是遗传功能失活的晚复制X染色体（图1a，Xl）。

在X染色体的短臂上有三条深染的复制带，短臂末端和近着丝点侧为两条较宽的深带，中间有一条较窄的深带，它的整个长臂往往呈淡染色，有时在着丝点远端约1/3处出现一条深带。而另一条Xl染色体则整个染色体呈淡染色（图8a），有时在短臂近着丝点区出现一条深染色的带纹（图1b）（图8a）；在个别细胞中，Xl染色体的长臂远侧端约1/3处出现一条深带（图8a）。这说明，在X和Xl染色体的晚复制区域中也存在着显示深染的早复制区域。

BrdU掺入染色体DNA的时间，直接影响到晚复制X染色体的显示。Wang（1976）曾指出，BrdU处理2—3小时，就会产生清晰的晚复制位点。在我们的实验中，BrdU掺入2小时，绝大多数细胞不显带，而且没有观察到Xl；掺入3小时，仅个别细胞显

示出Xl染色体；BrdU掺入5、6、8小时后，大多数细胞染色体都能显示出易于识别的淡染色晚复制X染色体，尤其是在BrdU处理5小时的标本上，几乎所有的中期细胞都显示出了晚复制的X染色体。看来，在我们的实验条件下，中国仓鼠细胞收获前的5小时，用BrdU处理，是显示晚复制X染色体的适宜时间。

（二）小鼠（*Mus musculus*）

小鼠染色体（2n＝40）均为近端着丝点染色体（acrocentric）或末端着丝点染色体（telocentric），X染色体的大小介于2号和3号常染色体之间，通常，X染色体和大小类似的常染色体难以区分（Hsu 等，1967）。

小鼠细胞经BrdU避光掺入处理后，中期染色体都呈现复制带纹，以及淡染的晚复制X染色体(图2a)。在我们的实验条件下，处理8小时要比6小时更易显示晚复制X染色体。晚复制X染色体呈淡染色（图2 a，Xl）（图8 d），另一条X染色体显示复制带（图2a，X）。在许多Xl染色体中，着丝点远侧端约1/3的区域有一条深染的带纹（图2 b）（图8 d）；有些细胞中，Xl染色体着丝点呈深染色，着丝点远端约1/3处也出现一条深带（图2c）（图8d）；在个别细胞中，Xl染色体的末端有一条深带，着丝点区为深染，或者仅着丝点区是深染，而Xl染色体不存在末端深带（图8d）。看来在小鼠的晚复制X染色体的不同区段，复制顺序也存在着差异，Xl染色体上所显示出的深染带纹应是较早复制的区域，Somssich等（1981）指出，小鼠晚复制X染色体的中间区域最先复制，其次是远末端区域复制，然后才是染色体的其余部分复制。晚复制X染色体的着丝点区域深染色，并不是由于这个区域早复制所致，而是Lin等（1974）所指出的由于结构异染色质所特有的横切面不对称现象所引起。

（三）红颊獴（*Herpestes auropunctatus*）

獴是食肉目灵猫科獴属动物，雌性的2n＝36，常染色体包括30条中着丝点和亚中着丝点染色体和4条近端着丝点染色体，放射自显影技术证明X染色体是一对中着丝点染色体（Hsu等，1970）。獴肺成纤维细胞经BrdU避光处理6和8小时，染色体呈现复制带纹，其中的一条较大的中着丝点染色体呈淡染色，这就是晚复制染色体（Xl）（图3a，Xl），而大小与Xl相等的另一条中着丝点染色体则是X染色体，这条X染色体的两臂上各有三条深带（图3a，X）。

大多数Xl染色体呈均匀淡染色（图8c），而有些Xl染色体一条臂的近着丝点区有一条深染带（图3b）（图8c），这就是Xl染色体上的早复制区域。

（四）赤麂（*Muntiacus muntjak*）

雄性赤麂有三对常染色体，其中一对端着丝点染色体中的一条易位有X染色体，Y是一条小的亚中着丝点染色体。Sharma等（1974）用放射自显影技术证明雄性赤麂的Y染色体是晚复制染色体，Ved Brat等（1979）使用BrdU掺入技术也证明了这一点。我们采用改良的BrdU掺入技术，除了显示染色体带纹外，也同时显示Y是均匀的淡染色的晚复制染色体（图4）。Stubblefield（1975）曾指出，C带阳性区域通常是晚复制的。赤麂Y染色体富含结构异染色质，两者是相吻合的。

（五）黑麂（*Muntiacus crinifrons*）

黑麂是我国特有的珍贵麂属动物（施立明等，1984）。黑麂核型呈现复杂的多态性

(2n=9♂，8♀），用常规的核型分析方法难以精确鉴别其性染色体。

黑麂成纤维细胞经BrdU处理，就可区分晚复制的性染色体和常染色体。在雌性细胞中，有一条亚中着丝点染色体的整个短臂呈淡染色，而长臂显出清晰的带纹，可以和它相配对的另一条亚中着丝点染色体，短臂有三条深带，这两条染色体的长臂带纹完全一致，从而可知，这一对染色体就是常染色体和X染色体易位的复合体（图7），淡染的短臂就是晚复制X染色体（图5a，XI，图8b）有些晚复制X染色体的淡染区中部有一条深染的复制带，（图5b，图8b）。也就是说，这条亚中着丝点染色体的短臂才是真正的X染色体，而长臂则是和X染色体易位的常染色体。

BrdU处理的雄性黑麂中期染色体上都显示出复制带型，仅一条很小的亚中着丝点染色体呈均匀的淡染色，这就是晚复制的Y染色体（图6）。

总之，采用改进的BrdU掺入技术，省去细胞同步化处理，可同时得到复制带纹较为清晰的中期分裂相，淡染色的晚复制性染色体明显易辨。不同种类的哺乳动物，在收获细胞前8小时，用BrdU掺入处理，均能得到较满意的结果。

参 考 文 献

施立明等 1984 *Cytogenet. Cell Genet.*（印刷中）

Hoo, J., Parslow, M. I., and Chambers, D. 1979 Combination of differential sister chromotid staining, G-banding pattern, and X-inactivation pattern. *Hum. Genet.* 47:291-295.

Hsu, T. C., and Benirschke, K. 1967 An atlas of Mammalian chromosomes. Springer, New York, Vol. 1, Folio 17.

Hsu, T. C., and Benirschke, K. 1970 Ibid, Vol. 4, Folio 124.

Latt, S. A. 1973 Microfluorometric detection of deoxyribonucliu acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 70:3395—3399.

Mukherjee, B. B., Miller, O. J., Breg, W. R., and Bader, S. 1964 Chromosome duplication in cultured leucocytes from presumptive XXX and XXXXY human subjects. *Exp. Cell Res.* 34:333—350.

Scheres, J. M. J. C., Merkx, G. F. M., and Hustinx, T. W. J., 1982 Prometaphase banding of human chromosomes with Basic Fuchsin. *Hum. Genet.* 61:8—11.

Sharma, T., and Dhaliwal, M. K. 1974 Relationship between patterns of late DNA synthesis and C- and G-banding in muntjac chromosomes. *Exp. Cell Res.* 87:394—397.

Somssich, I., Hameister, H., and Winking, H. 1981 The pattern of early replicating bands in the chromosomes of the mouse. *Cytogenet. Cell Genet.* 30:222—231.

Stubblefield, E. 1975 Analysis of the replication pattern of Chinese hamster chromosomes using 5-Bromodeoxyuridine suppression of 33258 Hoechst fluorescence. *Chromosoma* (Berl.), 53: 209—221.

Ved Brat, S., Verma, R. S., and Dosik, H. 1979 Structural organization of chromosomes of the Indian muntjac (Muntiacus muntjak), *Cytogenet. Cell Genet.* 24:201—208.

Wang, H. C. 1976 Identification of late DNA-replication regions in Chinese hamster chromosomes using a BrdU-Giemsa technique. *Chromosoma* (Berl.), 58: 255-261.

A TECHNIQUE FOR SIMULTANEOUSLY EXHIBITING CHROMOSOME REPLICATION PATTERNS AND LATE REPLICATING SEX CHROMOSOMES

Wang Jianhua Zhang, Xiran Chen Yuze

Shi Liming

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

In present study the technique simultaneously exhibited replication patterns along the chromosomes and late replicating sex chromosomes in mammals has been developed. Using this technique the studies of the chromosomes in 5 species of mammals, i.e. Chinese hamster (*Cricetulus griseus*), mouse (*Mus musculus*), Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*), red muntjac (*Muntiacus muntjak*), and black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) were performed. The results showed that all chromosomes of each species have exhibited replication patterns, and late replicating regions of sex chromosomes lightly stained. In female individuals a late replicating X chromosome which genetically was inactive slightly stained and could be discriminated from the autosomes and other X chromosome. Some of late replicating Xs were slightly stained evenly, but in other Xs late replicated there are several early replicating bands stained intensely. In male muntjac (red and black muntjac) Y chromosome was late replicating which was stained slightly. It was also demostrated that the technique are simple and reliable; replication patterns obtained by this method were clear, and slightly stained late replicating chromosome could be identified easily.